

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-131163

(43)Date of publication of application : 28.05.1996

(51)Int.Cl.

C12N 9/00
 C07H 21/04
 C12N 1/21
 C12N 5/10
 C12N 15/09
 // A61K 31/70
 A61K 31/70
 (C12N 1/21
 C12R 1:19)
 (C12N 5/10
 C12R 1:91)

(21)Application number : 06-277348

(71)Applicant : SANKYO CO LTD

(22)Date of filing : 11.11.1994

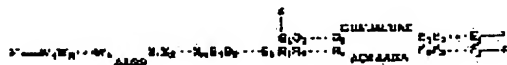
(72)Inventor : OTSUKA EIKO
 KOIZUMI MAKOTO

(54) DOMAIN CONVERSION HAIRPIN TYPE RIBOZYME

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject ribozyme for preventing and treating AIDS and tumors, etc., having high cleavage activity, specifically cutting polynucleotide, RNA, etc., comprising two polyribonucleotide containing a specific nucleotide sequence.

CONSTITUTION: This new domain conversion hairpin type ribozyme comprises two polyribonucleotide containing a nucleotide sequence of the formula (V is a uracil nucleotide; C is a cytosine nucleotide; A is an adenine nucleotide; G is a guanine nucleotide; B1 to Bh, D1 to De and E1 to Ej are each either of V, C, A and G; F1 to Fj are each a nucleotide complementary with E1 to Ej; S is A or C; Q1 to Qn, W1-Wh and X1 to Xm are each either of V, C, A or G; R1 to Rn are each a nucleotide complementary with Q1 to Qn; (h) is an integer of 1-50; (e), (j), (k), (m) and (n) are each an integer of 1-10), has higher cleavage activity, specifically cuts polynucleotide or RNA in organism efficiently and is effective for preventing and treating diseases such as AIDS and various tumors derives from RNA.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

10.08.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of

rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-131163

(43)公開日 平成8年(1996)5月28日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/00				
C 0 7 H 21/04	B			
C 1 2 N 1/21		8828-4B		
		7729-4B	C 1 2 N 5/ 00	B
		9281-4B	15/ 00	Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数17 O L (全 18 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平6-277348

(22)出願日 平成6年(1994)11月11日

(71)出願人 000001856

三共株式会社

東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号

(72)発明者 大塚 栄子

北海道札幌市中央区南10条西18-1-3-614号

(72)発明者 小泉 誠

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

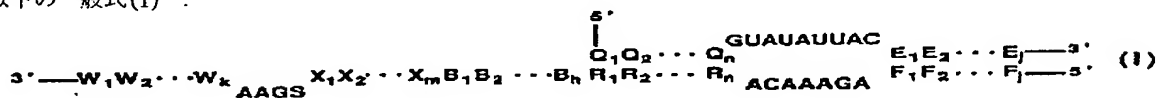
(74)代理人 弁理士 大野 彰夫 (外2名)

(54)【発明の名称】 ドメイン変換ヘアピン型リボザイム

(57)【要約】

【化1】

【構成】本発明は、以下の一般式(I)：



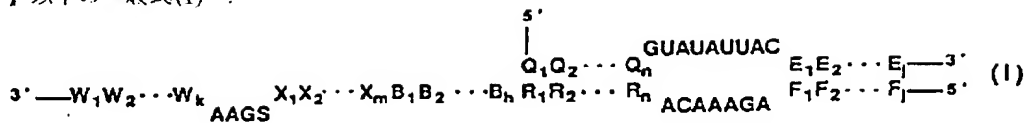
で示されるヌクレオチド配列を含む2本のポリリボヌクレオチド(式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cはシトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gはグアニンヌクレオチド、 $B_1 \sim B_n$ 、 $E_1 \sim E_j$ 、 $Q_1 \sim Q_n$ 、 $W_1 \sim W_k$ 及び $X_1 \sim X_m$ は各種ヌクレオチドのいずれか、 $F_1 \sim F_l$ は $E_1 \sim E_j$ にそれぞれ相補的なヌクレオチド、Sはアデニンヌクレオチド又はシトシンヌクレオチドのいずれか、 $R_1 \sim$

R_n は $Q_1 \sim Q_n$ にそれぞれ相補的なヌクレオチド、 h は1～50の整数、 j 、 k 、 m 、 n は1～10の整数を表す。)等を提供するものである。

【効果】本発明におけるリボザイムは従来のヘアピン型リボザイムよりも高い切断活性を有していることより、生体内で目的のポリリボヌクレオチドと効率よく切断することが期待される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】以下の一般式(I)：



で示されるヌクレオチド配列を含む2本のポリリボヌクレオチド(式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cは、シトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gは、グアニンヌクレオチドを表し、 $B_1 \sim B_h$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $E_1 \sim E_j$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $F_1 \sim F_i$ は $E_1 \sim E_j$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、Sはアデニンヌクレオチド又はシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Q_1 \sim Q_n$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $R_1 \sim R_n$ は $Q_1 \sim Q_n$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $W_1 \sim W_k$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $X_1 \sim X_m$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、hは1～50の整数を表し、j、k、m、nは同一又は異なって1～10の整数を表す。)

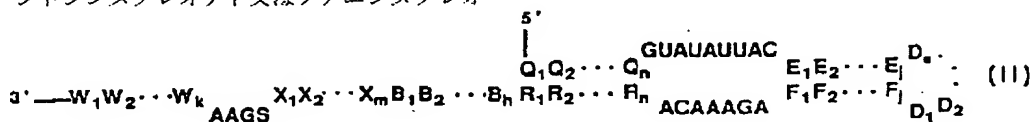
【化1】

【請求項2】請求項1記載の一般式(I)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、hが3～20であり、j、k、m、nが同一又は異なって3～10であるポリリボヌクレオチド。

【請求項3】請求項1記載の一般式(I)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、hが19であり、jが4または5であり、k、mは同一又は異なって3～10であり、nが3または4であるポリリボヌクレオチド。

【請求項4】分子中に、以下の一般式(II)：

【化2】



で示されるヌクレオチド配列を含むポリリボヌクレオチド(式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cは、シトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gは、グアニンヌクレオチドを表し、 $B_1 \sim B_h$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $E_1 \sim E_j$ は $E_1 \sim E_j$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、Sはアデニンヌクレオチド又はシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Q_1 \sim Q_n$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $R_1 \sim R_n$ は $Q_1 \sim Q_n$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $W_1 \sim W_k$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $X_1 \sim X_m$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、hは1～50の整数を表し、e、j、k、m、nは同一又は異なって1～10の整数を表す。)

【請求項5】請求項4記載の一般式(II)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、hが3～20であり、e、j、k、m、nが同一又は異なって3～10であるポリリボヌクレオチド。

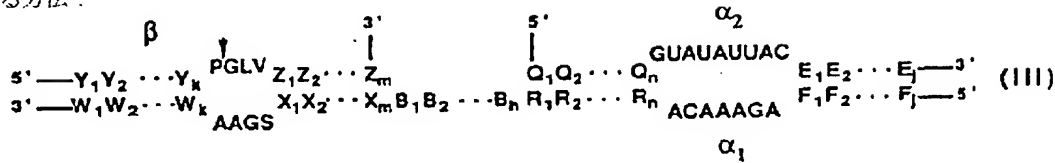
【請求項6】請求項4記載の一般式(II)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、hが19であり、jが4または5であり、e、k、mは同一又は異なって3～10であり、nが3または4であるポリリボヌクレオチド。

【請求項7】請求項4記載の一般式(II)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、eが4であり、hが19であり、jが4であり、k、mは同一又は異なって3～10であり、nが3または4であり、 D_1 、 F_4 がグアニンヌクレオチドであり、 D_2 、 E_4 がシトシンヌクレオチドであり、 D_3 、 D_4 がウラシルヌクレオチドであるポリリボヌクレオチド。

【請求項8】以下の一般式(III)で示されるヌクレオチド配列を含む2本のポリリボヌクレオチド α_1 及び α_2 を用いて、一般式(III)で示されるヌクレオチド配列

含むポリリボヌクレオチド β を式中の矢印の部位において切断する方法:

【化3】



(式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cは、シトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gは、グアニンヌクレオチドを表し、 $B_1 \sim B_h$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $E_1 \sim E_j$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $F_1 \sim F_l$ は $E_1 \sim E_j$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、Sはアデニンヌクレオチド又はシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Q_1 \sim Q_n$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $R_1 \sim R_n$ は $Q_1 \sim Q_n$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $W_1 \sim W_k$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $X_1 \sim X_m$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Pはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又は、グアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Lはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド又はシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、Vは、Sがシトシンヌクレオチドの場合にはアデニンヌクレオチドを表し、Sがアデニンヌクレオチドの場合に

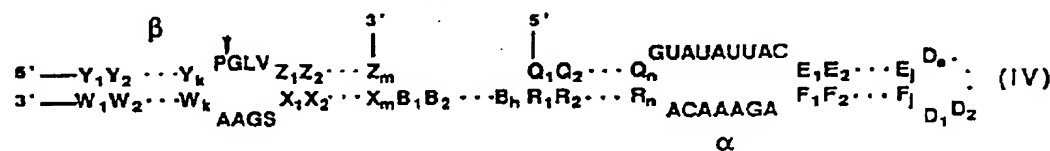
は、ウラシルヌクレオチド又はシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Y_1 \sim Y_k$ は $W_1 \sim W_k$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $Z_1 \sim Z_m$ は $X_1 \sim X_m$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、hは1～50の整数を表し、j、k、m、nは同一又は異なって1～10の整数を表す。)

【請求項9】請求項8記載の一般式(III)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、hが3～20であり、j、k、m、nが同一又は異なって3～10であるポリリボヌクレオチド α_1 及び α_2 を用いて、Lがウラシルヌクレオチドで、Vがシトシンヌクレオチドであるポリヌクレオチド β を切断する方法。

【請求項10】請求項8記載の一般式(III)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、hが19であり、jが4または5であり、k、mは同一又は異なって3～10であり、nが3または4であるポリリボヌクレオチド α_1 及び α_2 を用いて、Lがウラシルヌクレオチドで、Vがシトシンヌクレオチドであるポリヌクレオチド β を切断する方法。

【請求項11】以下の一般式(IV)で示されるヌクレオチド配列を含むポリリボヌクレオチド α を用いて、一般式(IV)で示されるヌクレオチド配列を含むポリリボヌクレオチド β を式中の矢印の部位において切断する方法:

【化4】



(式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cはシトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gはグアニンヌクレオチドを表し、 $B_1 \sim B_h$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $D_1 \sim D_e$ は、同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $E_1 \sim E_j$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $F_1 \sim F_l$ は、 $E_1 \sim E_j$ にそれぞれ相補的なヌクレ

オチドを表し、Sはアデニンヌクレオチド又はシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Q_1 \sim Q_n$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $R_1 \sim R_n$ は $Q_1 \sim Q_n$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $W_1 \sim W_k$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $X_1 \sim X_m$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Pはウラシルヌクレオチド、ア

デニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又は、グアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Lはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド又はシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、Vは、Sがシトシンヌクレオチドの場合にはアデニンヌクレオチドを表し、Sがアデニンヌクレオチドの場合には、ウラシルヌクレオチド又はシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Y_1 \sim Y_k$ は $W_1 \sim W_k$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $Z_1 \sim Z_m$ は $X_1 \sim X_n$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、hは1～50の整数を表し、j、k、m、nは同一又は異な

【請求項12】請求項11記載の一般式(IV)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、e、j、k、m、nが同一又は異なつて3～10であるポリリボヌクレオチド α を用いて、Lがウラシルヌクレオチドで、Vがシトシンヌクレオチドであるポリヌクレオチド β を切断する方法。

【請求項13】請求項11記載の一般式(IV)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、hが19であり、jが4または5であり、e、k、mは、同一又は異なつて3～10であり、nが3または4であるポリリボヌクレオチド α を用いて、Lがウラシルヌクレオチドで、Vがシトシンヌクレオチドであるポリヌクレオチド β を切断する方法。

【請求項14】請求項11記載の一般式(IV)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、eが4であり、hが19であり、jが4であり、k、mは、同一又は異なつて3～10であり、nが3または4であり、 D_1 、 F_4 がグアニンヌクレオチドであり、 D_2 、 E_4 がシトシンヌクレオチドであり、 D_3 、 D_4 がウラシルヌクレオチドであるポリリボヌクレオチド α を用いて、Lがウラシルヌクレオチドで、Vがシトシンヌクレオチドであるポリリボヌクレオチド β を切断する方法。

【請求項15】請求項1、2、3、4、5、6又は7記載のポリリボヌクレオチドをコードするDNA。

【請求項16】請求項15記載のDNAを含むことから成る組換えベクター。

【請求項17】請求項16記載の組換えベクターをトランスフェクトした宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、リボザイム活性を有するポリリボヌクレオチド、該ポリリボヌクレオチドをコードするDNA、該DNAを含むことからなる発現ベクター、該発現ベクターをトランスフェクトした宿主細胞、及び、該リボザイム活性を有するポリリボヌクレオチドによる基質ポリリボヌクレオチドの特定部位の切断方法に関する。

【0002】

【従来の技術】タバコリングスポットウイルスのサテラ

イトRNAの+鎖やアボカドサンプロッチウイロイドの+鎖や-鎖は、 Mg^{2+} 存在下自分自身の触媒活性で切断される(Science 231,1577-1580(1986))。この切断活性に必要なRNAの構造が明らかにされ、ハンマーヘッド型リボザイムと名付けられた。(Nucleic Acids Res. 14,3627-3640(1986))。このリボザイムを用いた標的RNAの配列特異的切断法も開発された(Nucleic Acids Res., 17,7059-7071(1989))。

【0003】一方、タバコリングスポットウイルスのサテライトRNAの一鎖も切断反応を起こし、特定部位での切断が明らかにされた(Nature 323,349-353(1986))。又、近年この切断に必要なRNAの最小領域が明らかにされた。(Biochemistry, 28,4929-4933(1989))。この触媒活性を持つRNAは50ヌクレオチドからなり、このRNA内にヘアピンループ構造を有するモデルが提唱され、ヘアピン型リボザイムと名付けられた。本発明者らや他の研究グループは、このヘアピン型リボザイムのヌクレオチドを他のヌクレオチドに変換し、切断反応に重要ないくつかのヌクレオチドを明らかにしている。(Nature 354,320-322(1991), Nucleic Acids Res. 19,6833-6838(1991), Nucleic Acid Res. 22,1096-1100(1994))。また、Burkeらのグループでは、ランダムな変異を持つDNAとPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法を用いたin vitro selectionによってヘアピン型リボザイムの切断反応と連結反応に重要な塩基配列を明らかにしている。(Gene & Development 6,129-134(1992), Gene & Development 7,130-138(1993))。本発明者らは、ヘアピンループ部分を欠失したRNAでも触媒反応が進行することも明らかにしている(Nucleic Acids Res. 19,6833-6838(1991))。

【0004】更に、本発明者らは、プロパンジオール・ホスフェートを1回から13回繰り返したリンカーを介して、基質の5'末端の水酸基と、2本鎖からなるヘアピン型リボザイムのうちの短い鎖の3'末端の水酸基を結合したRNAを合成した(図1)。これらのRNAの切断活性を調べると、プロパンジオールホスフェートを7回以上繰り返して、基質とリボザイムの1本の鎖を結合したものに天然型を上回る活性があることがわかった。

【0005】このことは、ヘアピン型リボザイムの4つのヘリックスのうち、ヘリックス2と3の間で折れ曲がった構造を有していることを示していた(J. Am. Chem. Soc. 116, 3602 (1994))。

【0006】

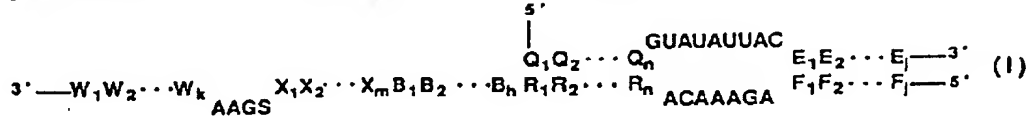
【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、ヘアピン型リボザイムの折れ曲がった高次構造を保持したまま、ヘアピン型リボザイムのドメインの結合位置を変換することを試みた。

【0007】図2に示したように、天然型のヘアピン型リボザイムは、触媒活性ドメインと基質結合ドメインが

ヘリックス2とヘリックス3で結合している。

【0008】本発明者の見出したリボザイムは、両ドメインを多量体のポリリボヌクレオチドを介してヘリックス1とヘリックス4の位置で結合したもので、図2にその一例を示す。本発明者らは、この得られたドメインを変換してポリリボヌクレオチドが高いリボザイム活性を有していることを見出し本発明を完成した。

【0009】本発明におけるリボザイムは従来のヘアピ



【0012】で示されるヌクレオチド配列を含む2本のポリリボヌクレオチド（式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cは、シトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gは、グアニンヌクレオチドを表し、 $B_1 \sim B_h$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $E_1 \sim E_j$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $F_1 \sim F_l$ は $E_1 \sim E_j$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、Sはアデニンヌクレオチド又はシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Q_1 \sim Q_n$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $R_1 \sim R_n$ は $Q_1 \sim Q_n$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $W_1 \sim W_k$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチ

ン型リボザイムよりも高い切断活性を有していることより、生体内で目的のポリリボヌクレオチドと効率よく切断することが期待される。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明は、(1)以下の一般式(I)：

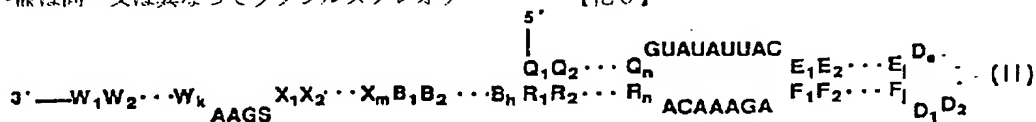
【0011】

【化5】

ド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $X_1 \sim X_m$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 h は1～50の整数を表し、 j 、 k 、 m 、 n は同一又は異なって1～10の整数を表す。)、(2) (1)記載の一般式(I)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、 h が3～20であり、 j 、 k 、 m 、 n が同一又は異なって3～10であるポリリボヌクレオチド、(3) (1)記載の一般式(I)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、 h が19であり、 j が4または5であり、 k 、 m は同一又は異なって3～10であり、 n が3または4であるポリリボヌクレオチド、(4)分子中に、以下の一般式(II)：

【0013】

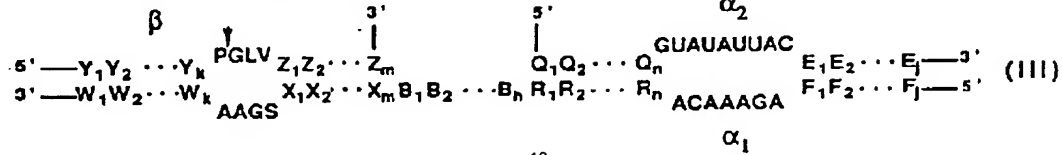
【化6】



【0014】で示されるヌクレオチド配列を含むポリリボヌクレオチド（式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cは、シトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gは、グアニンヌクレオチドを表し、 $B_1 \sim B_h$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $D_1 \sim D_e$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $E_1 \sim E_j$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $F_1 \sim F_l$ は $E_1 \sim E_j$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、Sはアデニンヌクレオチド又はシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Q_1 \sim Q_n$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $R_1 \sim R_n$ は $Q_1 \sim Q_n$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $W_1 \sim W_k$ は同一又は異なっ

てウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $X_1 \sim X_m$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 h は1～50の整数を表し、 e 、 j 、 k 、 m 、 n は同一又は異なって1～10の整数を表す。)、(5) (4)記載の一般式(II)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、 h が3～20であり、 e 、 j 、 k 、 m 、 n が同一又は異なって3～10であるポリリボヌクレオチド、(6) (4)記載の一般式(II)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、 h が19であり、 j が4または5であり、 e 、 k 、 m は同一又は異なって3～10であり、 n が3または4であるポリリボヌクレオチド、(7) (4)記載の一般式(II)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、 e が4であり、 h が19であり、 j が4であり、 k 、 m は同一又は異なって3～10であり、 n が3または4であり、 D_1 、 F_1 がグアニンヌクレオチドであり、

D₂、E₄がシトシンヌクレオチドであり、D₃、D₄がウラシルヌクレオチドであるポリリボヌクレオチド、(8)以下の一般式(III)で示されるヌクレオチド配列を含む2本のポリリボヌクレオチド α_1 及び α_2 を用いて、一般式(III)で示されるヌクレオチド配列を含むポリリボヌ



10

【0016】(式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cは、シトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gは、グアニンヌクレオチドを表し、B₁~B_hは同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、E₁~E_jは同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、F₁~F_lはE₁~E_jにそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、Sはアデニンヌクレオチド又はシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、Q₁~Q_nは同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、R₁~R_nはQ₁~Q_nにそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、W₁~W_kは同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、X₁~X_mは同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Pはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又は、グアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Lはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド又はシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、Vは、Sがシトシンヌクレオチドの場合には

20

30

クレオチド β を式中の矢印の部位において切断する方法：

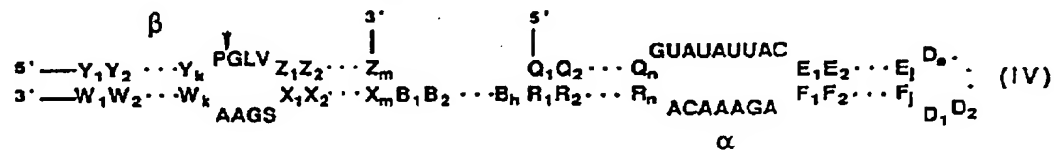
【0015】

【化7】

アデニンヌクレオチドを表し、Sがアデニンヌクレオチドの場合には、ウラシルヌクレオチド又はシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、Y₁~Y_kはW₁~W_kにそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、Z₁~Z_mはX₁~X_mにそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、hは1~50の整数を表し、j、k、m、nは同一又は異なって1~10の整数を表す。)、(9)(8)記載の一般式(III)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、hが3~20であり、j、k、m、nが同一又は異なって3~10であるポリリボヌクレオチド α_1 及び α_2 を用いて、Lがウラシルヌクレオチドで、Vがシトシンヌクレオチドであるポリヌクレオチド β を切断する方法、(10)(8)記載の一般式(III)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、hが19であり、jが4または5であり、k、mは同一又は異なって3~10であり、nが3または4であるポリリボヌクレオチド α_1 及び α_2 を用いて、Lがウラシルヌクレオチドで、Vがシトシンヌクレオチドであるポリヌクレオチド β を切断する方法、(11)以下の一般式(IV)で示されるヌクレオチド配列を含むポリリボヌクレオチド α を用いて、一般式(IV)で示されるヌクレオチド配列を含むポリリボヌクレオチド β を式中の矢印の部位において切断する方法：

【0017】

【化8】



【0018】(式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cはシトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gはグアニンヌクレオチドを表し、B₁~B_hは同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、D₁~D₂は、同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、E₁~E_jは同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、F₁~F_lはE₁~E_jにそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、Sはアデニンヌクレオチド又はシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、Q₁~Q_nは同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、R₁~R_nはQ₁~Q_nにそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、W₁~W_kは同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシン

50

ヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $X_1 \sim X_m$ は同一又は異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又はグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Pはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド又は、グアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Lはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド又はシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、Vは、Sがシトシンヌクレオチドの場合にはアデニンヌクレオチドを表し、Sがアデニンヌクレオチドの場合には、ウラシルヌクレオチド又はシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Y_1 \sim Y_k$ は $W_1 \sim W_k$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $Z_1 \sim Z_n$ は $X_1 \sim X_m$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、hは1~50の整数を表し、j、k、m、nは同一又は異なって1~10の整数を表す。)、(12)

(11)記載の一般式(IV)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、e、j、k、m、nが同一又は異なって3~10であるポリリボヌクレオチド α を用いて、Lがウラシルヌクレオチドで、Vがシトシンヌクレオチドであるポリヌクレオチド β を切断する方法、(13)

(11)記載の一般式(IV)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、hが19であり、jが4または5であり、e、k、mは、同一又は異なって3~10であり、nが3または4であるポリリボヌクレオチド α を用いて、Lがウラシルヌクレオチドで、Vがシトシンヌクレオチドであるポリヌクレオチド β を切断する方法、(14)

(11)記載の一般式(IV)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、eが4であり、hが19であり、jが4であり、k、mは、同一又は異なって3~10であり、nが3または4であり、 D_1 、 F_4 がグアニンヌクレオチドであり、 D_2 、 E_4 がシトシンヌクレオチドであり、 D_3 、 D_4 がウラシルヌクレオチドであるポリリボヌクレオチド α を用いて、Lがウラシルヌクレオチドで、Vがシ

トシンヌクレオチドであるポリリボヌクレオチド β を切断する方法、(15)(1)、(2)、(3)、

(4)、(5)、(6)又は(7)記載のポリリボヌクレオチドをコードするDNA、(16)(15)記載のDNAを含むことから成る組換えベクター、(17)(16)記載の組換えベクターをトランスフェクトした宿主細胞、に関するものである。

【0019】本発明のポリリボヌクレオチドは高いリボザイム活性を有し(以下、「リボザイム・ポリリボヌクレオチド」という。)、細胞中で一定の配列を有するポリリボヌクレオチドを特異的に切断する能力を有する。したがって、植物・動物又は人体を問わずこれらの生体に悪影響をもたらすポリリボヌクレオチドが存在する場合には、リボザイム・ポリリボヌクレオチドを用いて生体内にて特異的に該ポリリボヌクレオチドを切断することが可能である。

【0020】本発明のDNAは、本発明のリボザイム・ポリリボヌクレオチドをコードするものであり、好適なベクターを用いて細胞内に取り込ませることにより所望のポリリボヌクレオチドを特異的に切断する能力を有する。対象とする細胞は、植物・動物又は人体を問わない。

【0021】本発明のポリリボヌクレオチドのうち、好適には(2)、(3)、(5)、(6)又は(7)記載のポリリボヌクレオチドであり、さらに好適には

(3)、(6)又は(7)記載のポリリボヌクレオチドである。

【0022】最適には以下の化合物①(配列番号1)及び⑤(配列番号5)並びに①及び⑥(配列番号6)である。

【0023】

【化9】

5'-UUGUGGUAUAUACCUGGU-3'

①

3'-AACUGAAGAGACAAA(C)₁₂GCACACAAAGAGACC-5'

⑤

3'-AACUGAAGAGACAAA(C)₁₈GCACACAAAGAGACC-5'

⑥

【0024】また、本発明の切断方法のうち、好適には(9)、(10)、(12)、(13)、(14)記載の切断方法であり、さらに好適には(10)、(13)、(14)記載の切断方法である。最適には(14)の記載の切断方法である。

【0025】本発明の前記一般式(I)又は(II)で示され

る化合物は、塩の形で使用することができる。そのような塩としては、例えばナトリウム、カリウムのようなアルカリ金属；カルシウムのようなアルカリ土類金属；アンモニア；リジン、アルギニンのような塩基性アミノ酸；トリエチルアミンのようなアルキルアミン類；などの無機塩又は有機塩を挙げることができる。

【0026】本発明のポリリボヌクレオチドは、American Bionetics社または、ミリボア社より購入可能な2'-水酸基をtert-ブチルジメチルシリル基、5'-水酸基をジメトキシトリチル基で保護したヌクレオチド3'-O-ホスホロアミダイト体を用いて、Applied Biosystem社またはミリボア社のDNA/RNA自動合成機により所望の配列のものを合成することができる(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5764-5768(1988))。

【0027】リン酸基の保護基のβ-シアノエチル基の除去、ポリリボヌクレオチド鎖の担体からの切り出し及び塩基部のアシル基の除去をアルカリ処理により行い、テトラブチルアンモニウムフルオリド処理により2'-水酸基の保護基を除去し、酸処理を行って5'-水酸基の保護基を除去する。これに続く脱塩処理、逆相およびイオン交換クロマトグラフィー(高速液体クロマトグラフィーを含む。)等の各種クロマトグラフィー等、通常の核酸精製に用いられる精製操作で精製することにより、前記一般式(I)又は(II)に示される化合物を得ることができる。

【0028】リボザイム・ポリリボヌクレオチドによる基質ポリリボヌクレオチド鎖のin vitro 切断反応は、以下の操作により行うことができる。

【0029】基質として用いるポリリボヌクレオチドの5'末端をラジオアイソトープ等で標識する。この標識ポリリボヌクレオチドに対し、二価の金属イオンを含有する緩衝液中にてリボザイム・ポリリボヌクレオチドを加え加温する。

【0030】二価の金属イオンとしては、好適には、Mg⁺⁺、Ca⁺⁺、Mn⁺⁺、Pb⁺⁺等が用いられる。緩衝液としては、中性からアルカリ性で用いられる緩衝液であれば制限はないが、トリス-塩酸緩衝液、グリシルーグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液等が使用され得る。

【0031】反応温度は、0~100℃で好適であり、さらに好適には30~50℃である。

【0032】一定時間後、反応液中にEDTAを加えることにより反応を停止させ、この溶液についてホモクロマトグラフィーを行う。切断生成物をFujiiバイオイメージアナライザーBAS 2000システムで定量することにより切断率を算出することができる。

【0033】リボザイム・ポリリボヌクレオチドをコードするDNA鎖は、Applied Biosystems社DNA自動合成機により合成することができる。得られたDNAの配列決定は、例えばマキサム-ギルバートの化学修飾法(Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1980) : "Methods in Enzymology" 65, 499-559) やM13ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法(Messing, J. and Vieira, J. (1982) Gene 19, 269-276)により行うことができる。

【0034】また、このDNA鎖をアニーリングすることにより二本鎖とし、DNAリガーゼを用いて細胞内で作用するプロモーターの支配下に該二本鎖DNAを連結

し、発現ベクターを構築することができる。

【0035】この発現ベクターを宿主細胞へ導入することにより、本発明の宿主細胞を得ることができ、また、同時に本発明の発現ベクターを量産することができる。

【0036】宿主細胞としては以下のものが例示される。

【0037】原核細胞の宿主細胞としては、例えば大腸菌(Escherichia coli)や枯草菌(Bacillus subtilis)等が挙げられる。目的の遺伝子をこれらの宿主細胞内で形質発現させるには、宿主細胞と適合し得る種由来のレプリコン、すなわち複製起点及び調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞をトランスフェクトせねばよい。また、ベクターはトランスフェクトされた細胞に表現形質(表現型)の選択性を付与することができる配列を持つものが好ましい。

【0038】例えば、大腸菌としては、E. coli K12株等がよく用いられ、ベクターとしては一般にpBR322やpUC系のプラスミドがよく用いられるが、本発明ではこれらに限定されず、公知の各種の菌株及びベクターがいずれも利用できる。

【0039】プロモーターとしては、大腸菌においてはトリプトファン(trp)プロモーター、ラクトース(lac)プロモーター、トリプトファン・ラクトース(tac)プロモーター、リボプロテイン(lpp)プロモーター、バクテリオファージ由来のラムダ(λ) PLプロモーター、ポリペプチド鎖伸長因子Tu(tufB)プロモーター等が挙げられ、いずれのプロモーターも本発明のリボザイム・ポリリボヌクレオチドの産生に使用することができる。

【0040】枯草菌としては、例えば、207-25株が好ましく、ベクターとしてはpTUB28(Ohmura K. et al. (1984) J. Biochem. 95, 87-93)等が用いられるが、本発明はこれらに限定されない。

【0041】プロモーターとしては、枯草菌のα-アミラーゼ遺伝子の調節配列がよく用いられる。

【0042】真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えば、マウスの細胞であるNIH-3T3細胞(J. Virol. 4, 549-553, (1969))、サルの細胞であるCOS細胞(Gluzman Y., (1981) Cell 23, 175-182)やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO)のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株(Ur1⁻aub G. and Chasin, L.A., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220)等がよく用いられているが、本発明は、これらに限定されない。

【0043】脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNAのスプライシング部位、ポリアデニル化部位及び転写終結配列等を有するものを使用でき、これらはさらに必要に応じて複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40初期プロモーターを有するpSV2dhfr(Subramani S. et al. (1981) Mol. Cell. Biol. 1, 8

54-864)等を例示できるが、本発明はこれらに限定されない。

【0044】また、真核微生物としては酵母も使用し得る。該酵母等の真核微生物の発現ベクターとしては、例えば、アルコール脱水素酵素遺伝子のプロモーター(Bennetzen J. and Hall B. D., (1982), J. Biol. Chem., 257, 3018-3025)や酸性ホスファターゼ遺伝子のプロモーター(Miyanohara A. et al. (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1-5)等を使用できる。

【0045】このようにして得られたベクターを導入させることにより他の原核生物又は真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーター及び形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。

【0046】宿主細胞として大腸菌を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、pBR322複製起点を有し、大腸菌において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、翻訳開始シグナルを備えたものを用いることができる。該発現ベクターはカルシウムクロライド法(Mandel M. and A. Higa J. Mol. Biol. 53, 154 (1970))、Hanahanの方法(Hanahan D. and M. Meselson, Gene, 10, 63 (1980))及び電気パルス穿孔法(Neumann E. et al., (1982) EMB J. 1, 841-845)等により大腸菌に取り込ませることができる。かくして所望のベクターがトランスフェクトされた細胞を得ることができる。

【0047】上記で得られる所望のベクターがトランスフェクトされた細胞は、情報に従い培養することができ、該培養により細胞内に所望のリボザイム・ポリリボヌクレオチドが産生される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものが適宜選択でき、例えば、上記大腸菌であればトリプトン・イースト培地(バクトトリプトン1.6%、イーストエキストラクト1.0%、NaCl 10.5%(pH7.0))やペプトン培地(DIFCO社)等を使用できる。

【0048】また、COS細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40複製起点を有し、COS細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナル及びRNAスプライス部位を備えたものを用いることができる。該発現ベクターはDEAE-デキストラン法(Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1295-1308)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法(Graham, F. L. and van der Ed, A. J. (1973) Virology 52, 456-457)及び電気パルス穿孔法(Neumann, E. et al. (1982) EMB J. 1, 841-845)等によりCOS細胞に取り込ませることができる。かくして所望のベクターがトランスフェクトされた細胞を得ることができる。

【0049】また、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現し得るベクター、例えばpRSV

neo(Sambrook, J. et al. (1989): "Molecular Cloning-A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY)やpSV2-neo(Southern, P. J. and Berg, P. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1, 327-341)等をコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより本発明のリボザイム・ポリリボヌクレオチドを安定に産生するトランスフェクト細胞を得ることができる。

【0050】上記で得られる所望のベクターがトランスフェクトされた細胞は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内にリボザイム・ポリリボヌクレオチドが産生される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記COS細胞であればRPMI-1640培地やダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に必要に応じ牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したものを使用できる。

【0051】本発明は、また、リボザイム・ポリリボヌクレオチドを用いて、基質ポリリボヌクレオチドを特異的に切断する方法に関する。本発明の方法を生体内で実施することにより、生体に悪影響をもたらすポリリボヌクレオチドを特異的に切断することが可能になる。

【0052】

【作用】本発明のリボザイム・ポリリボヌクレオチドは、動物や植物、又は人体に薬理上使用できる担体と共に直接投与することが可能である。それらの投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、又は、注射剤、点滴剤、坐薬等による非経口投与を挙げることができる。

【0053】また、本発明のリボザイム・ポリリボヌクレオチドはリポソーム等の運搬体中に封入し投与することも可能である。

【0054】その投与量は、症状、年齢、体重等によって異なるが、通常、経口投与では、成人に対して、1日約0.1 mgないし1000mgであり、これらを1回、又は数回に分けて投与することができる。また、非経口投与では、1回0.1 mgないし1000mgを皮下注射、筋肉注射、又は静脈注射によって投与することができる。

【0055】また、本発明のDNAを好適なベクターに組み込み該ベクターを生体に投与することにより、細胞内でリボザイム・ポリリボヌクレオチドを発現せしめ本発明の効果をj得ることも可能である。そのようなベクターとして、レトロ・ウィルスやワクシニア・ウィルスが例示できる。必要に応じて、該ベクターをリポソームに封入し投与することも可能である。

【0056】さらに、植物・動物やヒトの生体より細胞を摘出し、該細胞に本発明の発現ベクターをトランスフェクトして培養し、細胞内にて所望のリボザイム・ポリリボヌクレオチドを産生する能力を付与した後に、このトランスフェクトされた細胞を元の生体に移植して、特定のポリリボヌクレオチドに対する耐性を該生体にもた

らすことも可能である。この方法を利用することにより、例えば、ヒト生体を、エイズ等の特定の疾患に関連するポリリボヌクレオチドや、癌遺伝子に関連するポリリボヌクレオチドに対して耐性にすることが可能である。

【0057】

【実施例】以下、実施例及び参考例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

【0058】実施例1

ポリリボヌクレオチドの合成

10

5'-UUGUGGUAUAUUUACCUGGU-3'

①

3'-AACUGAAGAGACAAA(C)₃GCACACAAAGAGACC-5'

②

3'-AACUGAAGAGACAAA(C)₆GCACACAAAGAGACC-5'

③

3'-AACUGAAGAGACAAA(C)₉GCACACAAAGAGACC-5'

④

3'-AACUGAAGAGACAAA(C)₁₂GCACACAAAGAGACC-5'

⑤

3'-AACUGAAGAGACAAA(C)₁₅GCACACAAAGAGACC-5'

⑥

3'-AACUGAAGAGACAAA(A)₆GCACACAAAGAGACC-5'

⑦

【0060】RNA断片は1 μ mol スケールで合成した。

【0061】合成終了後、合成したオリゴヌクレオチドが結合したCPG(Controlled PoreGlass)を濃アンモニア水：エタノール(3:1 v/v)混液で室温1時間処理をし、溶媒を留去後、5mlのエタノール性飽和アンモニアを加え、55℃で16時間加温した。溶媒を留去し、残った溶液に1mlの1M TBAF(Tetrabutylammonium fluoride)/THF(Tetrahydrofuran)溶液を加え、室温で24時間攪拌した。これに5mlの0.1M Triethylammonium acetate(pH7.0)を加えた後、C18シリカゲル(ウォーターズ社製)カラムクロマトグラフィーを行った(カラムサイズ0.7×15cm:5-40% CH₃CN, 50mM Triethylammonium bicarbonate の溶媒を用いた濃度勾配に

40

5'-水酸基がジメトキシトリチル基、2'-水酸基がtert-ブチルジメチルシリル基で保護されたヌクレオシド3'-ホスホロアミダイト(アメリカン・バイオティク社より購入)を用いて、DNA自動合成機(Applied Biosystems 社製 394 DNA/RNA synthesizer)で以下のポリリボヌクレオチド①~⑦(配列番号1~配列番号7)を合成した。

【0059】

【化10】

より溶出)。約30%濃度のCH₃CNで溶出されるジメトキシトリチルの発色を有するフラクションを集め、5mlの0.01N HClを加え、1時間攪拌した。0.1Nアンモニア水で中和後、水層を酢酸エチルで洗浄し、溶媒留去後滅菌水1.2mlに溶解した。この画分中のポリリボヌクレオチドを逆相HPLC、イオン交換HPLCで分取し精製した。

【0062】逆相HPLCは、Inertsil ODS(ϕ 4.6×250mm GLサイエンス社製)カラムまたはInertsil PREP-ODS(ϕ 10×250mm GLサイエンス社製)カラムを用い、A溶液として5%CH₃CNを含む0.1M Triethylammonium acetate(pH7.0)、B溶液として25%CH₃CNを含む0.1M Triethylammonium acetate(pH7.0)を用い、流速1ml/minで直線濃度勾配法により行った。

【0063】また、イオン交換HPLCはTSKgel DEAE 2SW

50

($\phi 4.6 \times 250\text{mm}$ 東ソー (株) 製) カラムを用い、A 溶液として 20%CH₃CN/H₂O、B 溶液として 20%CH₃CN を含む 2M HCOONH₄ 溶液を用い、流速 1 ml/min で直線濃度勾配法により行った。ポリリボヌクレオチド①～⑦についての逆相 HPLC 及びイオン交換 HPLC 溶出に用いた B 溶液のパーセントと保持時間を以下の表 1 及び表 2 に示す。

【0064】
【表 1】

ポリヌクレオチド		(直線濃度勾配)		
番号	B %	の全時間	保持時間	カラム
①	: 20%→40%	20 分	18.0 分	A
②	: 30%→50%	20 分	13.6 分	B
③	: 30%→50%	20 分	15.2 分	B
④	: 30%→50%	20 分	15.2 分	B
⑤	: 30%→50%	20 分	15.4 分	B
⑥	: 30%→50%	20 分	13.6 分	A
⑦	: 30%→50%	20 分	15.2 分	B

* カラム A : Inertsil ODS ($\phi 4.6 \times 250\text{mm}$)
B : Inertsil PREP-ODS ($\phi 10 \times 250\text{mm}$)

【0065】

【表 2】

イオン交換 HPLC

ポリヌクレオチド		(直線濃度勾配)	
ロット	B %	の全時間)	保持時間
①	: 35%→55%	20 分	7.9 分
②	: 30%→50%	20 分	17.2 分
③	: 35%→55%	20 分	11.7 分
④	: 35%→55%	20 分	13.6 分
⑤	: 35%→55%	20 分	12.4 分
⑥	: 30%→50%	20 分	20.0 分
⑦	: 30%→50%	20 分	16.7 分

参考例 1

基質ポリリボヌクレオチド及び対照となるポリリボヌクレオチドの合成

以下の基質ポリリボヌクレオチド⑨ (配列番号 9) とヘアピン型リボザイムの塩基配列を持つ対照となるポリリボヌクレオチド⑧ (配列番号 8) を実施例 1 記載の方法

に従い合成し分取精製した。ポリリボヌクレオチド⑧及び⑨についての逆相 HPLC 及びイオン交換 HPLC 溶出に用いた B 溶液のパーセントと保持時間を以下の表 3 及び表 4 に示す。

【0066】

【化 11】

3'-GCACACAAAGAGACCAACUGAAGAGACAAA-5'

⑧

5'-UGACAGUCCUGUUUC-3'

⑨

【0067】

【表3】

逆相 HPLC

ポリボス		(直線濃度勾配)		
割合	B %	の全時間	保持時間	カラム
⑧	: 30%→50%	20 分	16.5 分	B
⑨	: 20%→40%	20 分	12.8 分	A

*カラムA: Inertsil ODS(φ4.6×250mm)

B: Inertsil PREP-ODS(φ10×250mm)

【0068】

【表4】

イオン交換 HPLC

ポリボス		(直線濃度勾配)	
割合	B %	の全時間	保持時間
⑧	: 30%→50%	20 分	15.2 分
⑨	: 25%→45%	20 分	14.4 分

実施例 2

基質ポリリボヌクレオチド⑨の5'末端標識

前述のポリリボヌクレオチド⑨200pmolに[γ-³²P]ATP(1μl, 1μCi)、緩衝液(4μl, 250mM Tris-HCl(pH 7.6)、50mM塩化マグネシウム50mM 2-メルカプトエタノール)、T4ポリリボヌクレオチドキナーゼ(1μl, 6単位 宝酒造(株))、滅菌水(14μl)を加え、37℃、1時間保温した。NENSORB20(Dupont社)を用いて、未反応の[γ-³²P]ATPと塩を除いた。これを滅

菌水に溶解し、5'標識オリゴヌクレオチドを得た。

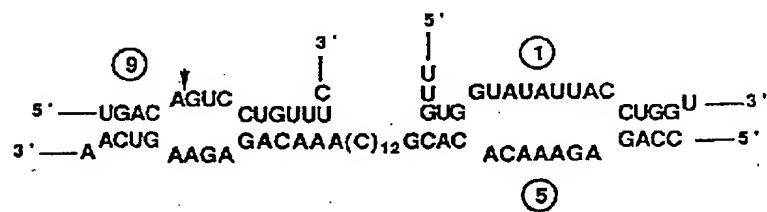
【0069】実施例 3

基質ポリリボヌクレオチドの切断

基質ポリリボヌクレオチド⑨に対する2本のポリリボヌクレオチド①、及び、②③④⑤⑥⑦⑧のいずれかの1つを用いた切断反応の一例を次に示す。

【0070】

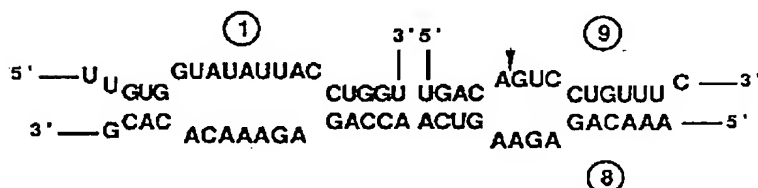
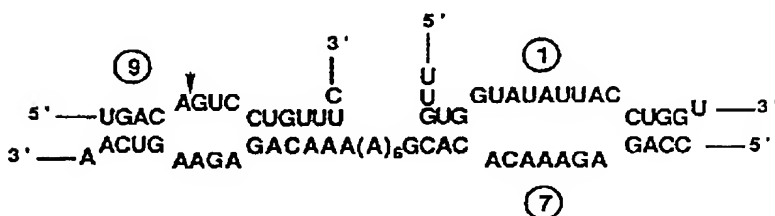
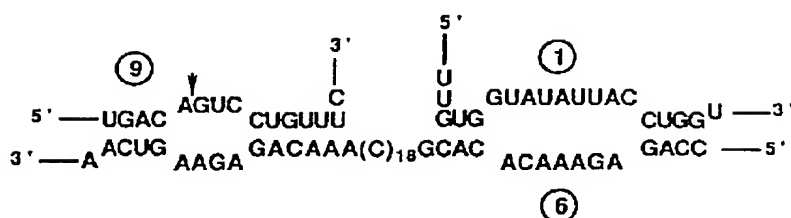
【化12】



【化13】

25

26



【0072】5'末端を標識した⑨(0.4pmol)を20μlの緩衝液(40mM Tris-HCl(pH7.5) 12mM MgCl₂, 2mM スペルミジン・3HCl)に溶解し、またリボザイム側の2本のポリリボヌクレオチド①、及び、②③④⑤⑥⑦⑧のいずれかの1つ(32pmol)も20μl 同緩衝液に溶解後それぞれを65℃で2分間加温後氷冷した。32℃で加温後リボザイム側の溶液を基質側に加えることで反応を開始した。

【0073】一定時間経過時に50mM EDTA 及び10M 尿素を含む溶液が5μl 入ったチューブ中に反応液を2μl サンプリングし反応を停止させ、基質分解の経時変化を観察した。8M尿素を含む20%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で切断生成物を分離し、切断率をバイオイメージアナライザー-BAS2000 システム(フジフィルム社(株)製)を用いて求めた。それぞれの反応様式を以下に示す。

【0074】結果を図3に示す。⑨のポリリボヌクレオチドは①及び⑧のオリゴヌクレオチド配列を有する2本のポリリボヌクレオチドによって切断されることは、すでに報告されている(J. Am. Chem. Soc. 116, 3692(1994))。

【0075】図3のレーン1は、反応前のポリリボヌク

レオチド⑨である。

【0076】レーン2～7は、それぞれポリリボヌクレオチド⑨にポリリボヌクレオチド①及びポリリボヌクレオチド②～⑥または⑧のうちいずれかひとつを加え、32℃、20分間加温後の反応物を示している。切断によって生じた生成物は鎖長が短くなるため、ポリアクリルアミドゲル電気泳動上早く泳動された。

【0077】ポリリボヌクレオチド①及びポリリボヌクレオチド②～⑥のうちいずれかひとつによるポリリボヌクレオチド⑨の切断部位はポリリボヌクレオチド①及び⑧による切断部位と同じであることは、切断生成物のゲル電気泳動上の移動度がすべて同じであることから明らかとなった。また、この条件下での切断率を表5に示す。

【0078】

【表5】

レーン	リボザイム	切断率
1	添加しなかった	0 %
2	①及び②	30.7 %

27

3	①及び③	55.1 %
4	①及び④	68.0 %
5	①及び⑤	74.8 %
6	①及び⑥	80.5 %
7	①及び⑧	39.6 %

また、リボザイム側のポリリボヌクレオチドの濃度を20, 810, 2000, 4000, 8000nMになるようにして、切断反応を行い、その切断率の経時変化からみかけの反応速度定数(k)を求め、各リボザイムの濃度に対するkの値をプロットしたものを図4に示した(図中、白丸はポリリボヌクレオチド①及び②、黒丸はポリリボヌクレオチド①及び③、白四角はポリリボヌクレオチド①及び④、黒四角はポリリボヌクレオチド①及び⑤、ひし形はポリリボヌクレオチド①及び⑥、黒三角はポリリボヌクレオチド①及び⑧の反応を表す)。各リボザイムが一定の速度定数を示したリボザイムの濃度である8000nMにおけるkの値を表6に示す。

【0079】

【表4】

リボザイム	k (min ⁻¹)	相対値
①及び②	0.0313	1.1
①及び③	0.0566	2.1
①及び④	0.0832	3.0
①及び⑤	0.113	4.1
①及び⑥	0.137	5.0
①及び⑧	0.0274	1.0

この表6は、天然型のリボザイムである①及び⑧に比べドメイン変換型リボザイムが高い切断活性を有していることを示している。

【0080】また、ポリリボヌクレオチド①及び⑦(810

配列

UUGUGGUAUA GUACCUUGU

配列番号2

配列の長さ: 33

配列の型: 核酸

配列

CCAGAGAAAC ACACGCCCAA ACAGAGAAGU CAA

配列番号3

配列の長さ: 36

配列の型: 核酸

配列

CCAGAGAAAC ACACCCCCC CAAACAGAGA AGUCAA

配列番号4

配列の長さ: 39

配列の型: 核酸

配列

28

nM) によるポリリボヌクレオチド⑨(20nM)の切断反応をポリリボヌクレオチド①及び②(810nM) による切断反応と比較した。

【0081】その結果を図5に示す。レーン1~9はポリリボヌクレオチド①及び②によるポリリボヌクレオチド⑨の切断反応の経時変化(順に反応開始後、4, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 40, 50分後の切断反応)を示す。レーン10~18はポリリボヌクレオチド①及び⑦によるポリリボヌクレオチド⑨の切断反応の経時変化(順に反応開始後、2, 4, 6, 8, 10, 12, 20, 25, 30分後の切断反応)を示す。それぞれの時間における切断率の経時変化をプロットしたグラフを図6に示す(図中、白丸がポリリボヌクレオチド①及び②による切断反応、黒丸がポリリボヌクレオチド①及び⑦による切断反応を示す)。このことは、ポリリボヌクレオチド①及び⑦はポリリボヌクレオチド①及び②に比べ高い切断活性を有していることを示す。

【0082】

【発明の効果】本発明のリボザイム・ポリリボヌクレオチドを直接生体内に投与することにより、あるいは、これをコードするDNAを好適なベクターに組み込み生体内に投与することにより、生体に悪影響をもたらす天然のポリリボヌクレオチド又はRNAを特異的に切断することが可能になる。したがって、本発明により、RNAに由来するエイズや各種腫瘍等の疾患についての予防・治療効果が期待される。

【0083】

【配列表】

配列番号1

配列の長さ: 19

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

19

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

33

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

36

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

29

30

CCAGAGAAAC ACACGCCCCC CCCCACACAG AGAAGUCA

39

配列番号5

配列の長さ: 42

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

CCAGAGAAAC ACACGCCCCC CCCCCCAAA CAGAGAAGUC AA

42

配列番号6

配列の長さ: 48

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

CCAGAGAAAC ACACGCCCCC CCCCCCCCC CCAAACAGA GAAGUCA

48

配列番号7

配列の長さ: 36

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

CCAGAGAAAC ACACGAAAAA AAAACAGAGA AGUCA

36

配列番号8

配列の長さ: 30

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

AAACAGAGAA GUCAACCAGA GAAACACACG

30

配列番号9

配列の長さ: 15

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

UGACAGUCCU GUUUC

15

【図面の簡単な説明】

【図1】プロパンジオールホスフェートユニットを導入したヘアピン型リボザイムの構築図

【図2】2つのドメインの結合を変換したヘアピン型リボザイムの構築図

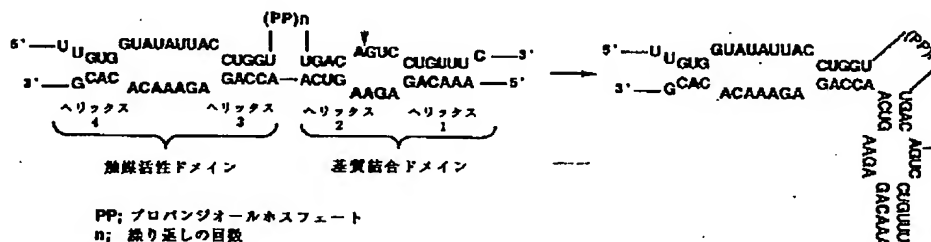
【図3】20%ポリアクリルアミドゲル電気泳動による基質ポリリボヌクレオチド切断反応の解析図

【図4】リボザイム反応濃度に対する基質ポリリボヌクレオチドの切断反応定数図

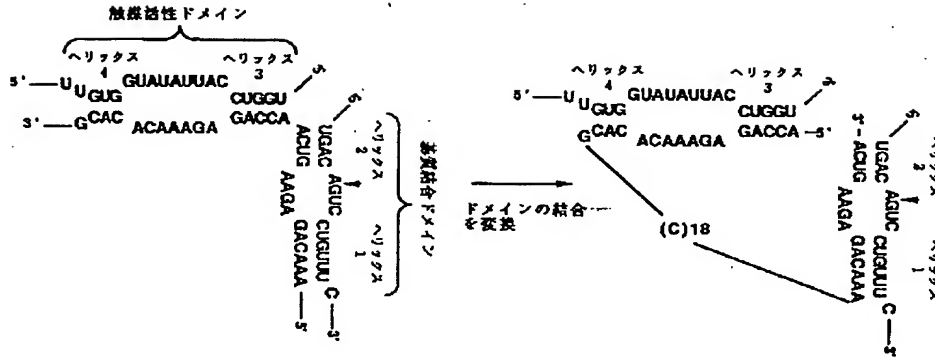
【図5】20%ポリアクリルアミドゲル電気泳動による基質ポリリボヌクレオチド切断反応の解析図

【図6】ポリリボヌクレオチド①及び②または①及び⑦による基質ポリリボヌクレオチドの切断反応の経時変化図

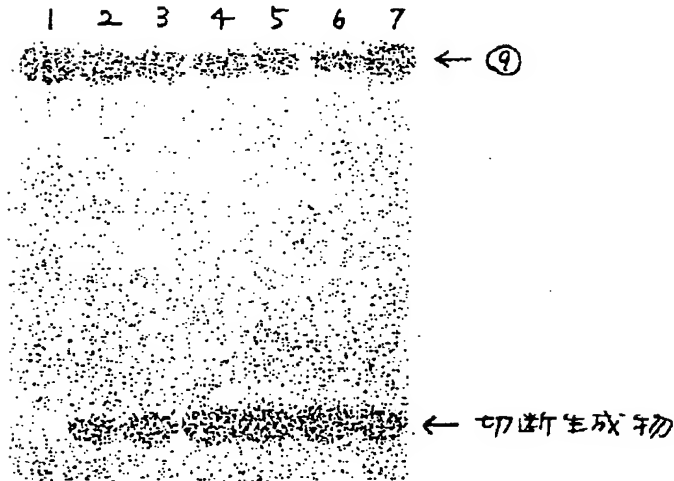
【図1】



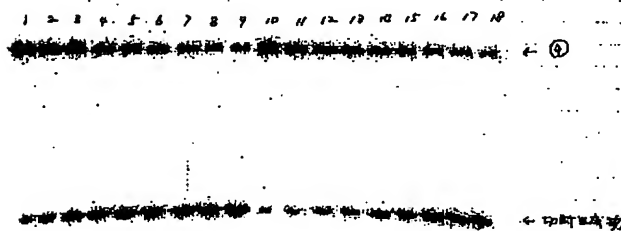
【図2】



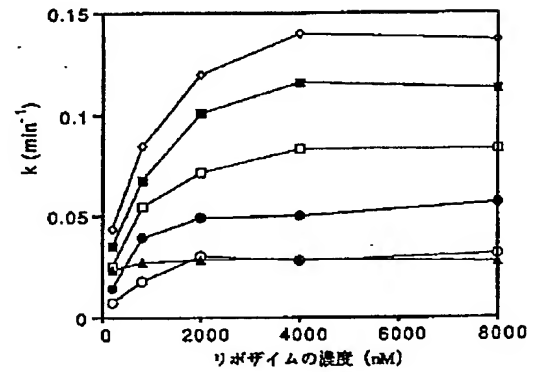
【図3】



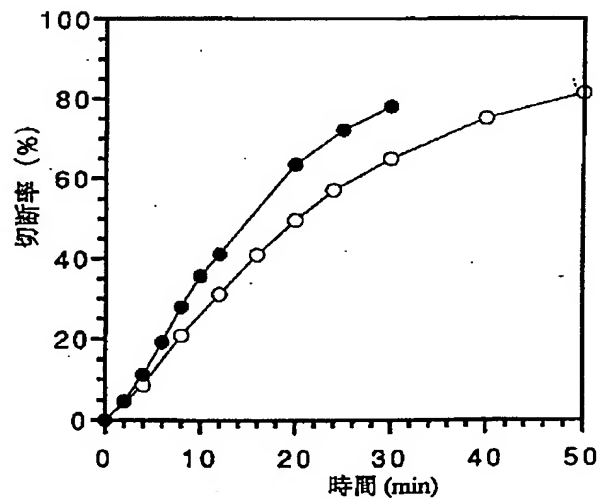
【図5】



【図4】



【図6】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 5/10				
15/09	Z N A			
// A 6 1 K 31/70	A B B			
	A D U			
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 N 5/10				
C 1 2 R 1:91)				
			(C 1 2 N 5/00	B
			C 1 2 R 1:91)	